

Ligaciones

En Biología Molecular es muy común realizar clonado de fragmentos de DNA en plásmidos comerciales. Para tal fin, una vez obtenido el segmento de DNA que uno desea amplificar (con el fin de realizar estudios posteriores), uno puede ligarlo a una molécula plasmídica autorreplicante con la intención de multiplicarlo. Para realizar esto uno tiene que “ligar” ambas moléculas de manera tal de generar una construcción híbrida que aún conserve la capacidad autorreplicativa en *E. coli*. y que posea insertada la secuencia deseada.

La maquinaria replicativa de los seres vivos se compone de varias enzimas, entre las que encontramos la DNA ligasa. La misma cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre dsDNAs con un OH 3' y otro con un fosfato 5' (ambas moléculas con extremos cohesivos o en su defecto ambas con extremos romos). De acuerdo a la enzima que se utilice, la reacción tiene diferentes requerimientos. La DNA ligasa de *E. Coli* presenta actividad en presencia de β -NAD, mientras que la DNA ligasa de fago T4 lo hace en presencia de ATP.

La definición de unidad enzimática aparece en general, como la cantidad de enzima requerida para generar el 50% de ligación de un DNA de fago λ digerido con Hind III en 30 minutos a 16°C en un volumen final de 20 μ l conteniendo una concentración 0,12 μ M de 5' terminal.

Un protocolo posible de ligación sería de la siguiente manera:

Vector de clonado (10 ng/ μ l)	1 μ l
DNA a insertar (N ng/ μ l)	x μ l (ver fórmula)
Buffer ligasa (10X o 5X)	Vf/10 μ l o Vf/5 μ l
Ligasa T4	1U (1U/ μ l)
H ₂ O	Vf - (Vf/10 μ l o Vf/5 μ l + x μ l + 1 μ l)
Vf	Vf

De acuerdo a la siguiente fórmula para calcular las masas a introducir...

$$[\text{ng inserto}] = (\text{R} \times [\text{ng plásmido}] \times [\text{pb inserto}]) / \text{pb} [\text{plásmido}]$$

...donde R es la relación molar entre plásmido e inserto, siendo su valor dependiente del tamaño de las moléculas implicadas y de la calidad y compatibilidad de sus extremos.

La mezcla de reacción se incuba a la temperatura recomendada por la empresa proveedora de la enzima, que usualmente es 4°C, 16 °C o 22 °C, de acuerdo a los tiempos de incubación empleados. En general, las temperaturas altas son recomendables para ligaciones cortas (1 hora), mientras que las más bajas son para incubaciones largas (*overnight*).

Referencias.

- 1) Catálogo Gibco (1999).
- 2) Catálogo New England (1999).
- 3) Catálogo Promega (1999).
- 4) “Ligation of cohesive Termini”, “Ligation of Blunt-ended DNA”. Molecular cloning. Sambrook, Fritsch y Maniatis.